

MVDr. Jarmila Z l á m a l o v á , Forschungsinstitut für Fleisch,
Brno. (Direktor: MVDr. V. Pokorný.)

Vorkommen von Proteuskeimen im Fleisch während der
technologischen Verarbeitung.

Derzeit tritt ein grosser Umsturz in der Fleischverarbeitung ein, welche sich jetzt in eine Industrieverarbeitung umwandelt. Diese Entwicklung stellt aber erhöhte hygienische Anforderungen auf das Fleisch während seiner ganzen Verarbeitung. Wenn man früher die Qualität des Fleisches vom mikrobiologischen Standpunkte nach der Quantität von Mikroflora beurteilte, legt man heute den Hauptnachdruck auf die Qualität der anwesenden Keime.

Aus den neusten Arbeiten verschiedenen Autoren ist bekannt, dass eine ganze Reihe bisher saprophytischen Mikroflora sich an der Entstehung verschiedenen Erkrankungen mit dem mannigfaltigen klinischen und bakteriologischen Bild beteiligt, welche gesamt als Enterotoxikosen genannt werden. Als Ursache dieser Vergiftungen, die sich meist als Störungen des Verdauungstraktes mit gutartigem Verlauf offenbaren, pflegt irgendeine Mikroflora zu sein, deren Pathogenität bei peroralem Durchdringen in den Mikroorganismus nicht eindeutig nachweisbar ist. Man kann bisher die Bedingungen nicht definieren, unter welchen sich diese Keime als Hervorrufers unspezifischer Massenerkrankungen beteiligen können. In diesen Fällen sind die alimentären Vergiftungen in erster Reihe durch Toxine, welche die Keime erzeugen, verursacht, in zweiter Reihe entsteht die Erkrankung unter dem Einflusse der Wirkung der Zersetzungsprodukte, die in den verderbenden Nahrungsmitteln entstehen.

Die Ansichten der hygienischen Arbeiter in der Lebensmittelindustrie auf die Bewertung dieser sogenannten bedingt pathogener Mikroflora sind nicht übereinstimmend. Dazu tritt noch die Frage der Variabilität pathogener Eigenschaften eines und desselben Stammes zu. Es würde sehr schwer die Ansicht auf die be-

dingt pathogene Mikroflora im den Sinne bestehen, alle Nahrungsmittel, welche Keime, die unter diesem Begriff fallen, enthalten, ganz aus dem Konsum auszuschliessen. Diese Mikroflora kann nämlich im kleineren Ausmasse sehr oft in den Nahrungsmitteln anwesend sein, ohne eine Abweichung in der Qualität des Nahrungsmittels zu verursachen, oder die Gesundheit des Konsumenten zu bedrohen. Man muss deshalb diesen Fragen eine erhöhte Aufmerksamkeit zuwenden und die Ergebnisse der bakteriologischen Befunde so bewerten, dass durch überflüssig strenge Massnahmen aus dem Verkauf gute Erzeugnisse auf einer Seite ausgeschieden werden, oder auf anderer Seite dass man bei der Bewertung des Vorkommen bedingt pathogener Mikroflora in den Nahrungsmitteln zu bestimmten Konzessionen gelangt, was als Folge sogar einer Gesundheitschädigung des Menschen haben könnte.

In dieser Arbeit wurde die Frage der Ekologie der Proteuskeime und deren Variabilitäten in der Morphologie und Physiologie im Laufe der technologischen Verarbeitung des Fleisches in den Vordergrund gestellt. Bei den Versuchen wurden einerseits die Proteusstämmen aller vier Biotypen aus der Staatlichen Sammlung der Kulturen aus dem Institut für Epidemiologie und Mikrobiologie in Prag, andererseits Stämme, die bei der ökologischen Forschung waren, benutzt. Das Studium der Ekologie der Proteuskeime in der Fleischerzeugung hat eine grosse Bedeutung deshalb, weil erst die Feststellung der Vorkommenstellen oder des Einflusses der technologischen Operationen kann als Grundlage für die Ausarbeitung der hygienischen Richtlinien sein.

Es ist bekannt, dass bei der Ermüdung der Schweine vor der Schlachtung, während der Betäubung, oder im Laufe eines langen Intervalles zwischen der Betäubung und Ausblutung zu einer Überschwemmung des Organismus durch Keime aus dem Verdauungstrakte kommt. Daraus ist zu schliessen, dass der Proteus auf diese Weise in die Muskulatur eindringt und so ihre primäre Infektion, die nicht auf einer unhygienischen Verarbeitung des Fleisches beruht, verursachen kann. Trotzdem, dass bei 75 Schweinen die Proteuserecheinung in der Urinblase, im After, auf der Fleischoberfläche und in der Tiefe der Muskulatur verfolgt wurde, gelangt es nicht denselben Biotyp aus dem After und aus der Muskulatur oder aus der Urinblase und der Muskulatur zu isolieren. Die Frequenz

der Proteuskeime war bei den bakteriologisch untersuchten Tieren in den Rektalabstrichen 6,7%, in den Urinblasesabstrichen 2,6%, auf der Fleischoberfläche 6,7% und in den Proben der Tiefmuskulatur 5,5%.

Aus den kultivierten Proteusstämmen erschienen am häufigsten die Biotypen *P. vulgaris*, vereinzelt *P. subtilis*. Die übrigen zwei Biotypen gelang es nicht zu isolieren. Der *Proteus inconstans* wurde in dieser Arbeit nicht verfolgt.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass Massenuberschwemmung des Fleisches durch Proteuskeime vor der Schlachtverarbeitung der Tiere wenig wahrscheinlich ist. Die durchgeführten Versuche haben zwar die Möglichkeit einer primären Infektion des Fleisches durch diese Keime nicht ausgeschlossen, haben aber diese Theorie auch nicht unterstützt.

Beweiskräftig wurde die sekundäre Verunreinigung des Fleisches durch Proteuskeime an der Oberfläche der Schweinehälften festgestellt, aber weniger beweisend für die sekundäre Kontamination ist der Proteusbefund in der Muskulatur zwei Stunden nach der Schlachtung. Diese Hypothese bestätigten auch die Ergebnisse der Kultivationen, durchgeführt aus dem Schweinefleisch 24 Stunden nach der Schlachtung und im Kühlraum bei der Temperatur 6°C bewahrt.

Die Fleischproben wurden unter steriler Bedingungen aus dem *M. quadriceps femoris* aus der Tiefe circa 5 cm unter der Muskelbinde entnommen. Aus 180 untersuchten Keulen wurde der Proteus in 7,7% kultiviert. Aus den Biotypen überwiegte *P. vulgaris*. Weniger oft erschienen der Biotyp *P. mirabilis* und ganz vereinzelt *P. morgani* und *rettgeri*. Diese Befunde bezeugen, dass schon in den ersten 24 Stunden nach der Schlachtung merkant die Zahl der positiven Befunde steigt. Diese Tatsache unterstützt beträchtlich die Hypothese über die schnelle Adaptibilität der Proteuskeime zum Umgebungsmedium.

An der Oberfläche der Schweineschinken erhöhte sich binnen 24 Stunden nach der Schlachtung die Zahl der positiven Ergebnisse auf das Zweifache, also circa auf 14%. Aus den Biotypen wurde überwiegend *P. vulgaris*, vereinzelt ein anderer Biotyp vertreten.

Bei der Abkühlung des Fleisches kam zu keiner Einstellung des Wachstums dieser Keime im Fleische, trotzdem dass sie sich bei diesen Temperaturen *in vitro* nicht vermehren. Daraus ist es klar, dass der Proteus im Fleisch das optimale Medium und sogar auch bei den Kühlraumtemperaturen zur Vermehrung findet.

Man gelang zu einer interessanten Erkenntnis, bei der ökologischen Forschung in der Rinderschlachthalle, wo es aus 270 Proben nicht einen einzigen Proteusstamm zu kultivieren gelang.

Die verfolgten Keime gelang es nicht einmal aus den Abstrichen von den Fleischoberfläche zu isolieren. Deshalb kann man mit Recht vermuten, dass der Proteus, der so oft im Fleisch, welches zur Erzeugung bestimmt ist, gefunden wird, erst bei der weiteren Verarbeitung in das Fleisch dringt, namentlich in den Zerlegungshallen und in den Erzeugungsräumen.

Aus diesem Grunde wurde zu der Verfolgung der Proteuskeime in den Erzeugungsräumen zugetreten. Es wurde festgestellt, dass diese Mikroorganismen hier in viel häufigerer Zahl der abgenommenen Proben des Fleisches vorkommen als bei der Abnahme in der Schlachthalle oder im Kühlraum 24 Stunden nach der Schlachtung.

Als Beweis einer Sekundären Kontamination war der Proteusbefund im gleichen Prozent wie im gesalzenem Schwein- so auch Rinderzeugungsfleisch. Die gewonnenen Befunde bestätigten die Vermutung, dass der Proteus in das Fleisch, in welchem ursprünglich kein Proteus war, erst bei der weiteren technologischen Verarbeitung kommt. Zur ersten massiven Infektion kommt es also bei dem Salzen.

Die Biotypen, welche in dem gesalzenen Fleische erscheinen, gehören zu den Biotypen, welche die Gelatine verflüssigen. Proteus vulgaris war in dem gesalzenen Fleisch im ganzen in zweifacher Menge als P. mirabilis anwesend. Es gelang auch weitere zwei Biotypen zu isolieren, aber ihre Anwesenheit ist vernachlässigbar.

Weitere Reinfektion des zur Produktion bestimmten Fleisches tritt bei seiner Verarbeitung auf das Brät und das Gut ein. Die Proteusanwesenheit im Gute wurde in 30% der abgenommenen Proben festgestellt. Beide Biotypen, Proteus vulgaris und mirabilis wurden gleichmässig vertreten. P. mirabilis fand wahrscheinlich im vorbereiteten Fleisch günstigere Bedingungen für seine Vermehrung als der Biotyp vulgaris, welcher sich dagegen mehr in

den Kühlräumen im gesalzenen Fleisch vermehrte.

Obwohl die Proteuskeime in dem Gut in so grosser Anzahl identifiziert wurden, trotzdem bei der Untersuchung der Produkte, welche aus diesem Gute erzeugt wurden, wurde kein positiver Befund gewonnen. Unter die verfolgten Erzeugnisse waren Brühwürste, Dauerwaren und Spezialitäten inbegriffen. Daraus geht hervor, dass die technologischen Vorgänge, die man in der Fleischindustrie benützt, für die Devitalisation der Mikroflora genügend wirksam sind. Diese Tatsache berechtigt keineswegs die Arbeiter in der Fleischindustrie stark infiziertes Fleisch zur Erzeugung zu benutzen, denn die technologischen Operationen devitalisieren zwar lebende Keime, aber vernichten keineswegs ihre Toxine.

Gleichzeitig wurde eine hygienische Depistage von Erzeugungsräumen mit Rücksicht auf das Vorkommen von Proteuskeimen durchgeführt. Es wurden die Abstriche von den Holz- und Metalltischen und von den Händen der Arbeitern abgenommen. Die erzielten Ergebnisse bewiesen, dass die nächste Stelle der Fleischinfektion ungenügend hygienisch erhaltene Arbeitstische sind, in deren Rillen Fleischreste übrig bleiben auch ganz geringe und schwer wahrnehmbare, welche aber einen optimalen Nährboden für diese Mikroflora vorstellen. Man kann sich also darüber nicht aufhalten, dass Proteus auf den Tischen aus mehr als 50% abgenommenen Abstrichen isoliert wurde, während sein Vorkommen im Gute in 30% von Proben wurde.

Dasselbe hohe Proteus Prozent auf den Händen der Arbeiter ist eine schwer lösende Frage. Wenn auch die Keime nur aus dem Fleische auf die Hände gelangen, ist es notwendig eine so grosse Händeverunreinigung durch erhöhte hygienische Massnahmen zu verhindern.

Es entstand auch eine Vermutung, dass ein beträchtliches Prozent der Proteuskeime sich auch in den zur Füllung vorbereiteten Därmen vorkommt. Aus diesem Material gelang es aber nicht diese Mikroflora zu isolieren. Der Proteus wurde nur in einigen Proben von Schafedärmen anwesend, dabei war es nicht ganz möglich eine Reinfektion der Därmen in den Erzeugungsräumen auszuschliessen. Dieses negative Ergebnis kann man durch Versuche

171
mittels bezeugte Tatsache nachweisen, dass bei der langfristigen Lagerung der Därme, welche mit Salz durchstreut wurden, die Qualität so wie auch die Quantität der Mikroflora, namentlich der unsporobildender Mikroflora wesentlich beeinflusst wird.

Bei den *Proteus*-Stämmen, welche aus dem frischen wie auch technologisch bearbeiteten Fleisch, aus den Abstrichen von den Tischen und Händen der Arbeiter in den Erzeugungsräumen isoliert wurden, wurde die Biotypisation nach den Kriterien, wie sie Bergoy zitiert, durchgeführt. Einige Tests wurden nach Kauffmann ergänzt. Zum näheren Studium der Stämme wurde deshalb getreten, um zufällige systematische Abweichungen von den typischen Stämmen in den grund- oder differentieldiagnostischen Tests festzustellen. Diese Abweichungen könnten die Ergebnisse bei der Einreihung der Stämme in die Familie *Enterobacteriaceae* beeinflussen.

Bei den Stämmen, die aus dem Fleisch 24 Stunden nach der Schlachtung isoliert wurden, entsprechen die biochemischen Reaktionen im allgemeinen den üblichen Ergebnissen. Keiner aus den Stämmen des Biotypus *vulgaris* hatte völlig alle übereinstimmende Tests, zum Beispiel Mannitospaltung war negativ bei 90% der Stämme, Lakmismilch säuerte sich in 60%, Schwefelwasserstoff stellte sich in 95% dar, Maltosespaltung war in 95%, der Simonsboden hatte eine positive Reaktion in 10%.

Dagegen waren 100% Ergebnisse in folgenden Tests: Gelatineverflüssigung, Phenylalanin, Urea, Spaltung der Glukose, Galaktose, Saccharose, Voges-Proskauers-Test, Indolentstehung.

Beim Biotyp *Proteus mirabilis* hatten alle benutzte Tests hundertprozentige Ergebnisse. Nach Kauffmann waren bei beiden die Gelatine verflüssigenden Typen abweichende Ergebnisse in der Reaktion des Glykosides Salicin und monosaccharides Arabinose. Die übrigen von Kauffmann zitierten Tests hatten entsprechende Reaktion: der KCN-Test, MR-Test, Adonit-, Dulcit-, Rhamnose- und Dextrosespaltung.

Aus den durchgeführten Untersuchungen ist es klar, dass die biochemischen Reaktionen für die *Proteus*-keime keinen grundsätzlichen Charakter zur Unterscheidung der Stämme besitzen, welche aus verschiedenen Substraten (wie frisches oder bearbei-

tetes Fleisch, oder pathologisches Material) herkommen. Ausserdem wurde keine Abhängigkeit unter den verschiedenen Ergebnissen der einzelnen Testen gefunden. Manche Stämme zeigten eine sehr schwache biochemische Aktivität. Aus diesem Grunde machte die Einreihung der Stämme beträchtliche Schwierigkeiten. Die Stämme, die aus den Erzeugungsräumen und zwar wie aus dem gepökeltten Schweine- und Rindfleisch, so auch aus dem Bräte und Gute, zeigten in ihrer biochemischen Aktivität keine abweichende Eigenschaften gegenüber den Stämmen aus dem Fleische 24 Stunden nach der Schlachtung. Ebenfalls wurde kein merkenter Unterschied in den Testen bei den Stämmen, welche aus verschiedenen Erzeugungsräumen isoliert wurden, gefunden. Die Stämme, welche von Abstrichen von Tischen und den Händen der Arbeiter gewonnen wurden, unterschieden sich wesentlich nicht von den Stämmen, welche aus dem Fleische isoliert wurden.

Diese Erkenntnisse lösen bloss die grundsätzliche Orientierungsproblematik über das Vorkommen und die Eigenschaften von Proteuskeime in der Fleischproduktion. Für das Verfolgen der Einflüsse von technologischen Vorgängen wurden Modellversuche durchgeführt, in denen man Schweinefleisch, welches künstlich mit Sammlungsproteusstämmen infiziert wurde, benützte.

Um vergleichen zu können, ob die Ergebnisse der Versuchsarbeiten nicht teilweise verzerrt sind, wurde als Kontrolle auch ein Stamm, der aus der Tiefe des Schweinefleisches 24 Stunden nach der Schlachtung isoliert und genau biochemisch und serologisch identifiziert wurde, benützt. Zur Verzerrung der Ergebnisse könnte auch bei der Beurteilung der Thermoresistenz der angewandten Keime, eventuell der Veränderungen in den biochemischen Testen kommen, weil die Sammlungsstämme, die in den Versuchen angewandt wurden, nicht aus den Nahrungsmitteln isoliert wurden.

Für die Modellversuche wurde das Fleisch zerkleinert und so infiziert, dass in einem Gramm Fleisch etwa 50.000 Keime waren. Zur Verfolgung des Pökelineinflusses wurde eine sterile Lake von hoher Konzentration (18°Bé) benützt. Das Versuchsmaterial wurde bei 6°C gelagert. Die morphologischen Veränderungen bei den gewonnenen isolierten Keimen traten schon den zweiten

Tag nach der Lskewirkung ein. Bei allen Biotypen kam es zur Verkürzung und teilweise auch Verstärkung der Stäbchen. In derselben hörte die Beweglichkeit der Stäbchen des Biotypus *P. morganii* auf. Nach 2 Tagen kam es zur weiteren Verkürzung der Stäbchen so, dass sie durch ihre Form mehr ovoiden Kokken als den Stäbchen ähnelten. Diese Veränderungen nahmen im nächsten Tag immer zu, bis endlich die Stäbchen, die meistens zu zwei gereiht wurden, die Form der Diplokokken erreichten. Mit diesen morphologischen Veränderungen bringt auch die Beschränkung und endlich auch die gänzliche Einstellung der Beweglichkeit zusammen. Weitere Veränderungen wurden in der Affinität zur Gramfärbung, bei der sich urspr. G-Stäbchen G labil färbten. Bei dem Versuche zeigte sich eine grosse adaptive Fähigkeit der *Proteus* auf ein neues Medium und sogar auch auf niedrigen Temperaturen, denn nach 5 Tagen der Lskewirkung kam es wieder zur langsamen Erlangung der ursprünglichen Form. Die kokkenartigen Keime bekamen wieder ihren stäbchenartigen Charakter, die Stäbchen waren aber stärker als bei den Bouillonkulturen. Sie färbten sich wieder Gramminus. Die Beweglichkeit blieb beschränkt bei dem Stamme *P. vulgaris* und *mirabilis*. Die anderen Biotypen waren nach dem Pökeln unbeweglich. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass nach längerer Zeit auch diese Stämme wieder ihre Beweglichkeit im ursprünglichen Ausmasse erreichen könnten. Bei der Feststellung der biochemischen Tests gelangte man zur Erkenntnis, dass das Salzen die Aktivität von *Proteus* weder bei den Sammlungsstämmen, noch bei den Stämmen aus dem Fleisch isolierten keineswegs beeinflusste. In einer weiteren Reihe von Versuchen wurde den Einfluss des Salzes in der Konzentration, welche in der Fleischproduktion üblich ist, verfolgt. Es wurde festgestellt, dass das Salz in angewandter Menge nicht inhibitorisch auf das Wachsen der eingepfachten Keime wirkt. Was die morphologischen Veränderungen anbelangt, kam es im Verlaufe des Salzens zur mässigen Verkürzung und Verdickung der ursprünglich schlenken Stäbchen. Diese Veränderungen kehrten nach 5-tätigem Salzen nicht zum Normal zurück. Die Beweglichkeit blieb fast unverändert. Die Affinität zur Gram-Färbung war nicht beeinflusst. Aus diesen Versuchen ging hervor, dass das Salzen auf trockenem Wege, bei einer Salzkonzentration wie in der Fleischtechnologie üblich ist, keinesfalls die *Proteus*-Vitalität im Fleisch ungünstig beeinflussen kann. Die biochemischen Tests bei den Keimen durch-

geführt nach 5-tätigem Salzen waren in allen biochemischen Reaktionen identisch mit den Keimen aus den Bouillonkulturen.

Sehr ungünstig zeigte sich bei dem Proteuswuchs des Räuchern und zwar so wie mit dem warmen so auch mit dem kalten Rauch. In 24 Stunden nach Beendigung der Einräucherung waren in keinem Versuche die eingepflichten Keime zu finden. Diese Tatsache bezeugt, dass das Räuchern die Mikroflora völlig vernichtet.

Sehr wichtige Erkenntnisse wurden bei der Verfolgung des Einflusses von Brühen erzielt. Das Brühen wurde bei Erzeugnissen hergestellten aus künstlich infiziertem Fleisch im Wasserbad bei einer Temperatur von 55, 60, 65, 70 und 75°C durchgeführt. Die Anfangstemperatur der Erzeugnisse, bei der sie in das Wasserbad gelegt wurden, war 8°C. Die innere Temperatur erreichte in 18 Minuten die Höhe von 55°C und die Endtemperatur von 75°C wurde in den Erzeugnissen in 45 Minuten erreicht. Es wurde festgestellt, dass eine Temperatur von 55°C die eingepflichten Sammlungstämmen nicht vernichtete, ausserhalb den Biotyp *Proteus rettgeri*. Bei einer Temperatur von 60°C, die in 22 Minuten erreicht wurde, wurden alle *Proteus* biotypen, ausserhalb des Biotyp *P. vulgaris* mit dem Antigen H, vernichtet. Erkenntnis von einer verhältnismässig hoher Thermoresistenz eines Stammes, der sich ausserdem sehr gut zu seiner neuen Umgebung adaptieren verstand, ist sehr bedeutend für die Fleischerzeugung. Dagegen eine sehr kleine Widerstandsfähigkeit gegen Erwärmung wurde bei aus dem Fleisch isolierten Stämme festgestellt, der schon bei Temperaturen, welche niedriger als 55°C waren, vernichtet wurde.

Beim Verfolgen der biochemischen Aktivität der erwärmten Stämme wurden keine wesentliche Abweichungen von den Ergebnissen der Bouillonkulturen festgestellt, ausgenommen der Fähigkeit der Gelatineverflüssigung. Diese Änderung war aber reversibel.

Aus den durchgeführten Versuchen wurde festgestellt, dass das Fleischmedium für die *Proteus* keime einen optimalen Boden vorstellt, der ihre Aktivität unterstützt. Die technologischen Prozesse, die in der Fleischerzeugung, d. i. Salzen und Pökeln, benützt werden, erhöhen die adaptive Fähigkeit der Keime. Zur Ein-

stellung des Wachstums kommt durch das Räuchern und Wärmebearbeitung. Isolierte Keime aus dem Fleisch haben keine biochemische Eigenschaften stabiler Charakters, durch welche sie sich von den Proteusstämmen, welche aus anderem, eventuell pathologischen Material isolierten, unterscheiden liessen. Insbesondere die Biotypen *Proteus vulgaris* und *mirabilis* haben die Fähigkeit sich bei der Temperatur der Kühlräume zu vermehren. Die abweichende Eigenschaft der Stämme, welche aus dem Fleisch isoliert wurden, ist ihre Thermolabilität.